

08/409621
PCT/JP96/02099 6

25.07.96

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

REC'D 20 SEP 1996
WIPO PCT

出 願 年 月 日
Date of Application:

1995年 7月25日

出 願 番 号
Application Number:

平成 7年特許願第188972号

出 願 人
Applicant(s):

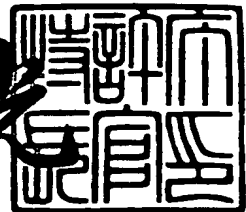
東レ株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 9月 6日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平08-3061855

【書類名】 特許願

【整理番号】 66A20060-A

【提出日】 平成 7年 7月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/21

【発明の名称】 骨疾患治療薬

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社基礎研究所内

【氏名】 井田 亘隆

【特許出願人】

【識別番号】 000003159

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号

【氏名又は名称】 東レ株式会社

【代表者】 前田 勝之助

【電話番号】 03-3245-5648

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 005186

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨疾患治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 β 型インターフェロンを有効成分とする骨疾患治療薬。

【請求項2】 β 型インターフェロンが天然型もしくは遺伝子組み換え型である請求項1記載の治療薬。

【請求項3】 骨疾患が若年性、突発性、閉経後性、もしくは老人性の骨粗鬆症である請求項1もしくは請求項2記載の治療薬。

【請求項4】 骨疾患が癌関連の骨疾患である請求項1もしくは請求項2記載の治療薬。

【請求項5】 骨疾患が代謝性骨疾患である請求項1もしくは請求項2記載の治療薬。

【請求項6】 骨疾患がホルモン異常に起因する、あるいは物理的外力に基づく骨折である請求項1もしくは請求項2記載の治療薬。

【請求項7】 骨疾患が歯周病に関連する歯槽骨疾患である請求項1もしくは請求項2記載の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はインターフェロン、特に β 型の骨疾患治療薬に関するものであり、物理的、代謝学的、癌など様々な原因による骨疾患に対し、予防または治療薬として利用される。

【0002】

【従来技術】

骨は脊椎動物においてその体を支える重要な組織である。その見掛上のイメージとは異なり、骨は活発に、主に破骨細胞による破壊と骨芽細胞による形成を繰り返しており、両作用の絶妙なバランスのもとにその形態の恒常性を維持している。このバランスが崩れると様々な骨疾患が生じ、近年では、特に骨粗鬆症が医学的にも社会的にも大きな問題となっている（折茂 肇、小沢英浩 目で見える骨

粗鬆症、メヂカルビュー社、1990)。骨粗鬆症は必ずしも骨吸収が異常に高い状態でのみ出現する疾患ではなく、あくまでも骨形成反応と骨吸収反応の相対的バランスが崩れたことに起因する疾患である。具体的には、骨吸収および骨形成反応が共に盛んである高回転型、骨吸収および骨形成が共に低下している低回転型骨粗鬆症が存在し、前者はI型とも言われ閉経後の婦人に多発し、後者はII型とも言われ男女を問わず老人に多発する。

【0003】

骨吸収過程では破骨細胞が、骨形成過程では骨芽細胞がその主役を果たしている (Baron, R., et al., Bone and Mineral Res., 2, 175-243, Elsevier, New York, 1984) が、閉経あるいは老化と言った生理的反応以外にもこれらの細胞の増殖、分化、機能発現に影響し、結果的に両者の相対的バランスを乱すものは、その要因が物理的、化学的、生物学的、更に原因不明なものいずれであっても、各種骨疾患を引き起こすことが知られている。骨吸収及び骨形成の相対的バランスを乱すものには、例えば、癌関連としては肺癌、乳癌、腎癌の骨転移、多発性骨髄腫など、代謝性骨疾患としては骨ペーজেット病、クル病、骨軟化症、大理石病、変形性関節炎、骨形成不全症など、ホルモン異常性関連としては副腎皮質機能異常、副甲状腺機能異常に起因するもの、自己免疫異常によるとされながら原因がよく判っていない慢性関節リウマチ、その他歯周病に関連する歯槽骨疾患などがある。従って、特に骨密度が低下する骨疾患に対しては骨形成速度を相対的に高めるか、骨吸収速度を相対的に低下させる手段の適用が治療に有効であるとされている。

【0004】

骨芽細胞は中胚葉に由来する未分化間葉系細胞から分化してくる単核の細胞である。実験動物の骨組織から分離、採取された骨芽細胞はin vitroでも分裂増殖する性質があることから、多くの株化細胞が得られている。例えば、MC3T3-E1株 (Sudo, H. et al., J. Cell Biol., 96, 191, 1983)、ROS17/2株、UMR106株 (Fraser, J. D. et al., J. Biol. Chem., 263, 911, 1988)、RCT-3株 (Hearth, J. K. et al., Endocrinology, 124, 3060, 1988) などがある。

【0005】

破骨細胞は多核の大型細胞で (Wergedal, J. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134, 244, 1970, Clark, S.E. et al., J. Bone Mineral Res., 4, 399, 1989), カルシトニンレセプターを有し (Warshawsky, H. D. et al., J. Cell Biol., 85, 682, 1980, Nicholson, G. C. et al., J. Clin. Invest., 78, 355, 1986)、骨吸収においては骨基質に含まれるカルシウムをイオン化して体液中に移行させる (Blair, H.C. et al., Science, 245, 855, 1989) などの特徴を持っている。破骨細胞は発生学的には骨髓細胞から分化し形成される。骨髓もしくは脾臓の単核細胞を活性型ビタミンD3やプロスタグランジンE2などの共存のもとに培養すると破骨細胞の基本的性格を発現する破骨細胞様細胞が形成されることが知られている。(Takahashi, N. et al., Endocrinology, 122, 1373, 1988, Udagawa, N. et al., Endocrinology, 125, 1805, 1989)。

【0006】

インターフェロンは抗ウイルス作用、抗腫瘍作用を始めとして様々な生理活性を示すタンパク質であり、現在 α 型、 β 型、 γ 型が知られている。 α 型は主に白血球、リンパ芽球、NK細胞、B細胞など、 β 型は主に線維芽細胞、 γ 型は主にT細胞、NK細胞により産生される。いずれのインターフェロンについても主として既に抗腫瘍剤あるいは肝炎治療剤として市販され、ヒト臨床治療で使用されている。

【0007】

α 型インターフェロンの骨代謝への関与として、骨粗鬆症患者を活性型ビタミンD3あるいはカルシトニンで治療すると血液中のインターフェロン α レベルが増加することが報告され (Shiozawa, S. et al., Gerontol., 35, 305, 1989)、骨粗鬆症の治療効果と何らかの関係が示唆されている (藤田拓男, Clinical Calcium, 2, 852, 1992)。In vitroレベルでは、ヒト臍帯血を材料として各種ヒト遺伝子組み替え α 型インターフェロンによる破骨細胞様細胞の形成阻害の報告がある (穴井恭市ら, 日本骨代謝学会雑誌, 9巻, 238, 1991)。更に、ヒト遺伝子組み替え α 型インターフェロンによるC型肝炎の治療を行った患者では治療前に比べ骨吸収の指標となる尿中デオキシピリジノリンの値が低下

したり（吉田博昭ら、日本骨代謝学会雑誌、12巻、215、1994）、骨量が増加すること（川勝充ら、日本骨代謝学会雑誌、12巻、234、1994）が知られている。

【0008】

一方、 β 型の骨代謝に対する作用は未だに良く判っていない。In vivo レベルでの実験に関しては、マウス皮下に脱灰した骨マトリックスを移植したマウスにマウスインターフェロンを投与しても何等影響は無かったとの報告がある（Nilsson, O. S. et al., J. Interferon Res., 4, 135, 1984）。しかし、彼らの使用したインターフェロンは純品でなく且つ α 型と β 型の混合物であり、更に、観察しているの現象は異所性石灰化現象で、必ずしも真の骨組織の反応ではない。また、生化学的解析には弱点のあることを報告者自身が記載している。骨の器官培養系でもパラサイロイドホルモンで誘発した骨吸収をマウスインターフェロンが阻害するとの報告があるが、使用したインターフェロンは α 型と β 型の混合物である（Jilka, R. L. and Hamilton, J. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 553, 1984）。従って、 β 型インターフェロンの役割は曖昧なまま残されている。なぜなら、前述したように、混在 α 型インターフェロンのみでも同効果は説明されるからである。

【0009】

β 型での解明が遅れた理由の一つに、 α 型と異なり β 型インターフェロンが強く有する種特異性という性質がある。すなわち、 β 型インターフェロン試験の正当な評価は、本来その動物種に対応した動物の β 型インターフェロンで行わねばならない。前述したように骨量の増減はあくまでも骨形成系と骨吸収系への作用の相対的強弱で最終的に決定されるから、 β 型の骨に対する効果の判定は対応する動物種の β 型インターフェロンを用い、且つ厳密に、科学的にコントロールされた骨吸収系および骨形成系での比較実験で初めて可能になる。

【0010】

インターフェロンの骨代謝に及ぼす影響に関しては、 γ 型に関する報告が最も多い。その多くは、Takahashi らの確立した骨髓細胞からの破骨細胞様細胞の形成の実験系に於て、ブラジキニン（Lerner, U. H. et al., Agents and Ac

tions, 32, 305, 1991)、フォルスコリン、コレラトキシシン (Lerner, U. H. et al., J. Bone MinRes., 6, 551, 1991)、インターロイキン1 (Foffmann, O. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 38, 1987)、あるいは活性型ビタミンD3 (Gowen M. et al., J. Bone Min. Res., 1, 469, 1986) 刺激による破骨細胞様細胞の形成が γ 型インターフェロンによって阻害されることが示されてきている。またこれらの報告に先立ち、 γ 型インターフェロンの骨調節作用が既に提示されている (マインラット ペテルリック、特願昭 61-123862)。しかし、サイクロスポリンA 投与で誘起される実験動物のオステオペニアに対し、インターフェロン γ 投与は改善効果がなく、骨減少を引き起こす事実とその理由が骨塩沈着の抑制であろうとの示唆が最近報告されている (Mann, G. N. et al, Endocrinology, 135, 1077, 1994)。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来の物質的な曖昧さを解決し、かつ厳密にコントロールされた骨吸収系および骨形成系での相対評価から骨形成効果を明らかにし、医療上有用な骨疾患治療薬を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

前記課題を達成するため、本発明は下記の内容からなる。すなわち、 β 型インターフェロンを有効成分とする骨疾患治療薬である。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、先ず物質的な曖昧さを排する手段として遺伝子操作技術で大量生産され、高度に精製された β 型、 γ 型インターフェロンを用いた。その方法に関しては、それぞれ詳細な報告 (β 型マウスインターフェロン: Higashi, Y., et al., J. Biol. Chem., 258, 9522, 1983, Senda, T. et al, Proc. Japan Acad., 66, Ser.B, 77, 1990. および γ 型マウスインターフェロン: Gray, P. W. and Goeddel, D. V., Proc. Natl. Acad Sci., 80, 5842, 1983) がある。

【0014】

生物学的評価の曖昧さの解決手段としては、同一動物種さらに同系統動物に由来する骨形成系細胞および骨吸収系細胞に対する相対活性を定量的に扱い、従来法による評価の欠点解消を計った。すなわち、同種実験動物であっても、その系統により各種ホルモンへの反応性が大きく変化することから、骨吸収系-骨形成系への相対効力も同系統で検討する必要がある。例えば、I型骨粗鬆症のモデルとしてマウスから卵巣摘出を行う場合にも骨量減少率に関してマウスに系統差が明確に存在することが知られている（保坂努ら、アニテックス、5巻、243、1992）。そこで、本発明者らは、高純度のマウスインターフェロンを用い、かつ同系統のマウスに由来する骨形成系を担う骨芽細胞系と、骨吸収系を担う破骨細胞系への作用を厳密かつ定量的に比較した。

【0015】

その結果、 β 型インターフェロンは破骨細胞形成を極めて強力に阻害するのに対し、骨芽細胞系に対しては増殖能、分化能、石灰化能のいずれをも殆ど阻害しない事を初めて明らかにし本発明を完成した。

【0016】

さらに、 γ 型インターフェロンでの破骨細胞形成阻害を追認したが、骨形成系においては石灰化も強力に阻害されることを骨芽細胞のみより成る単純な *in vitro* レベルで初めて明らかにした。この事実は既に紹介した *in vivo* レベルでの γ 型インターフェロンでの石灰化不全の類骨形成の成績（Mann, G. N. ら、*Endocrinology*, 135, 1077, 1994）を良く説明するものである。即ち、硬組織としての骨組織の完成には石灰化は必須のプロセスであり、 γ 型に比べ β 型の性格は骨量改善に極めて好ましいものであることを証明した。

【0017】

β 型インターフェロンの強力な破骨細胞形成阻害は、腫瘍関連の骨疾患、例えば乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、腎癌、大腸癌、消化器癌、食道癌などの骨転移（Stoll, B. A., *Bone Metastasis: Monitoring and Treatment*, Raven Press, N.Y. 1983）に対し予防および治療薬として有効に用いられる。すなわち、腫瘍の骨転移巣の形成、進展に破骨細胞数の増加、活性化が密接に関わってい

るからである (Galasco, C. B. S., Skeletal Metastases, Butterworths, pp 22-51, 1986)。さらに、この β 型インターフェロンの強力な破骨細胞形成阻害作用が、腫瘍に随伴する高カルシウム血症 (腫瘍関連骨疾患の一態様) の治療に有効に用い得る。強力な破骨細胞形成阻害に加え、骨形成系細胞の増殖、分化、石灰化が支障無く進行し、相対的に骨形成へと生体反応を向かわせることから、 β 型インターフェロンは代謝性骨疾患、ホルモン異常性骨疾患、骨粗鬆症、骨折、齒槽骨疾患の予防的あるいは治療的な医薬として利用できる。

【0018】

本発明に用いられるインターフェロンは、 β 型、あるいは β 型のアミノ酸配列を含むコンセンサス型や、ハイブリッド型のいずれでもよく、また由来も天然型、遺伝子組み換え型、化学合成のいずれでもよい。

【0019】

本発明により得られるインターフェロン β はそれのみで医薬用途に用いてよいが、医薬品として容認し得る担体や医薬添加物を含んでいてもよい。例としては、水、生理食塩水、リンガー液、ハンクス液、およびグルコース液、ラクトース、デキストロース、エタノール、グリセロール、アルブミンなどの溶液を含む、非経口的投与に適した殆どのキャリアが含まれる。これらの組成物は、安定化剤、抗酸化剤、抗菌剤、防腐剤、緩衝剤、界面活性剤および他の付属の添加剤を必要に応じて含み得る。実際の添加物は本発明が対象とする疾患の予防あるいは治療剤の剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

【0020】

投与方法としては特に限定されるものではない。本発明の治療対象疾患に応じて投与方法が適宜選択される。経口的、皮下、筋肉内、腹腔内あるいは静脈内注射を含む非経口的に、全身的、経鼻的あるいは経肺的に投与され得る。また、浸透圧ポンプ (例えば、Alzet ミニポンプ、Alzet Corporation) など体内留置型の徐放方式に適した製剤も本発明の対象とする疾患により選択され得る。経鼻的あるいは経肺的な投与方法に於ては、微少液滴あるいは微少粉体を作り出す医学的に許容された適当なデバイスの利用と共に液状剤型あるいは粉体剤型が選択

され得る。

【0021】

また本発明によるインターフェロン β は局所適応剤型としても利用される。例えば、注入、あるいは、持続放出型キャリアーの外科手術的埋め込みが治療部位に直接行われ得る。これらキャリアーとしてはヒドロゲル類、ポリ乳酸、およびコラーゲンマトリックス類が含まれる。コラーゲンマトリックス類としてはヒト以外の動物由来のコラーゲンを利用する場合はキャリアー自体の抗原性を消去したアテロコラーゲン（例えば、Zyderm, Collagen Corp., Palo Alto, CA）の利用が好ましい。また、整形外科、歯科領域に於て骨局所の再建に利用されるヒドロキシアパタイトカルシウムホスフェート（例えば、HA-TCP, Zimmer Inc., Warsaw, IN）も適当なキャリアーとして用い得る。但し、これらに特に限定されるものではない。

【0022】

本発明のインターフェロン β の正確な投与量は、被検体の年齢、体重、性別、および疾患の種類、特性、症状のステージなどにより変化する。従って、正確な投与量は前以て特定され得ず、治療するものによって決定される。しかしながら、適切な量はおおよそ全身治療としてはヒト1日投与量として約1万単位から約1000万単位の間にある。局所投与のための有効量は1万単位から約300万単位の間にある。

【0023】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき、より具体的に説明する。但し、下記実施例は例示のためにのみ示すものであり、いかなる意味に於ても限定的に解釈してはならない。

【0024】

実施例1

ddY 系統マウスの破骨細胞様細胞形成への作用：

1) 骨髄細胞の調製法および培養法

高橋らの方法（Takahashi, N. et al., Endocrinology, 122,1373,1988）に従

い骨髓細胞を調製した。7週齢のddY系の雄マウスをエーテル麻酔下、放血死させ後肢の大腿骨および頸骨を採取。骨表面の結合織を丁寧に除去し、骨両端をハサミで切り落とした。25G針を付けたシリンジを用い、10%初乳前子牛血清（以下JCSと略、三菱化成）添加 α -MEM培地（日水製薬）で骨髓細胞をフラッシュアウトし遠沈管に集め、上記培地で2000 rpm, 4℃で5分間遠心洗浄した。沈澱細胞を上記培地で分散させ、さらに2回遠心洗浄操作を繰り返しマウス骨髓細胞を調製した。 β 型マウスインターフェロン（MuIFN- β と表示）（Lot M-0034, 10^7 units/ml/vial、当社品）は10%JCS加RPMI-1640培地（日水製薬）にて目的のIFN濃度とした。 γ 型マウスインターフェロン（MuIFN- γ と表示）、（Lot 254F3, 2.06×10^6 units/ml、Genentech）は10%JCS加RPMI-1640培地のみにて希釈した。活性型ビタミンD3（ $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3、以下Vit D3と略記、和光純薬）はアルゴン置換エタノールに溶解、希釈し全ての培養系内でのエタノールの最終濃度は0.1%に調整した。

【0025】

2) 破骨細胞形成能の評価

トリパンプルーで上記骨髓細胞の生細胞数をカウント、10%JCS, 10^{-8} M Vit D3, 10^{-7} M デキサメサゾン添加 α -MEMで 1.5×10^6 個/mlになるように希釈し、24穴プレートの各ウェルに0.45mlづつ蒔いた。各濃度マウスIFN含有培地を50 μ l追加して培養を開始。3日毎に0.4mlの旧培地を抜取り、新鮮培地（各濃度IFNを含む上記培地）を0.4ml追加し培養、8日目に固定、酒石酸耐性酸ホスファターゼ（TRAP）染色を行い、TRAP陽性多核細胞を位相差顕微鏡でカウントした。

【0026】

図1は、この結果を示したものであり、各本系に添加したMuIFN- β およびMuIFN- γ はいずれも強力に破骨細胞様細胞の形成を阻害した。図中の各カラムは4例の平均値および標準誤差で示してある。マウスインターフェロン添加量を変えると明らかな用量依存性が両IFNで認められたが、その効果は γ 型の方が β 型より強力で γ 型のIC50は0.1 units/ml以下、 β 型のそれは0.2 units/mlであった。

【0027】

実施例 2

C 57 BL/6 系統マウスの破骨細胞様細胞形成への作用：

ddY 系マウスに代え、7 週齢の C 57 BL/6 系の雄マウスを用いた。エーテル麻酔下、放血死させ後肢の femur および tibia を採取した。骨表面の結合織を丁寧に除去し、骨両端をハサミで切り離した。25G 針を付けたシリンジを用い、10% JCS 添加 α -MEM で骨髓細胞をフラッシュアウトし遠沈管に集め、上記培地で 2000 rpm, 4°C で 5 分間遠心洗浄した。沈澱した細胞を上記培地で分散させ、さらに 2 回遠心洗浄操作を繰り返し、実施例-1 の方法に従い破骨細胞様細胞形成を測定した。

【0028】

その結果、ddY 系マウスでの場合と同様にマウス IFN- β および γ はいずれも強力に C 57 BL/6 系マウス骨髓細胞からの破骨細胞様細胞の形成を阻害した。図 2 は、この結果を示したものであり、各本系に添加した MuIFN- β および MuIFN- γ による破骨細胞様細胞の形成阻害の IC₅₀ 値はそれぞれ 0.1 units/ml および 1.5 units/ml であった。図中の各カラムは 4 例の平均値および標準誤差で示してある。

【0029】

実施例 3

マウス骨芽細胞の増殖に対する作用：

C 57 BL/6 マウス起源であるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (児玉ら、Jap. J. Oral Biol., 23, 899, 1982) を PBS(-) で洗浄後、0.1% プロナーゼ (アクチナーゼ E, 科研製薬) を溶解した PBS(-) で保温剥離し、10% JCS、50ug/ml の L-アスコルビン酸 (ASA) 加 α -MEM にて 10,000 個/ml に分散した。細胞増殖能に対する評価は MC3T3-E1 細胞を 24 穴プレート (Corning) 各 well に 5,000 個/ml ずつ蒔いた。ついで各インターフェロン希釈液を 0.1ml/well ずつ添加し培養開始した。Day 2 に培地を除去し、あらたに各 IFN 希釈液を 0.5 ml/well で添加 (液総量; 0.5ml / well)。Day 6 に培地除去、PBS (-) 洗浄後、0.1% プロナーゼ、0.1% コラゲナーゼ混合酵素液を 200 ul / well 添加し 37°C、15 分反応

した。ついで、300 μ l / well の 10% 牛胎児血清（以下 FCS と略、Gibco）加 α -MEM 培地を添加して分散、コールターカウンターにて細胞数を測定した。細胞増殖に対する作用を図 3 に示す。各カラムとも 4 例の平均値および標準誤差で表示してある。両マウスインターフェロンとも MC3T3-E1 細胞増殖に対する阻害作用は極めて弱いか、ほとんど無かった。MuIFN- γ で若干の増殖抑制が 1 単位/ml から認められるものの用量依存性に乏しく、10,000 単位/ml という高濃度であっても 30% 程度の抑制に留まった。一方、MuIFN- β では 10,000 単位/ml でも全く抑制の気配がなかった。

【0030】

実施例 4

マウス骨芽細胞の分化能、石灰化に対する作用：

分化能評価のパラメーターとしてはアルカリホスファターゼ（ALPase）および石灰化で評価した。骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼの検出は培養開始後 day 8 に染色法で行った。石灰化判定は細胞を 24 穴プレートの各 well に 50,000 個/ml（抗細胞試験の 10 倍量）ずつ細胞を蒔き、day 4 に細胞が十分にコンフルエントに達していることを確認の上、培地を捨て、新たに 0.9 ml / well の 10% JCS、50 μ g / ml の L-アスコルビン酸、10 mM β -グリセロリン酸加 α -MEM を添加し、次いで各濃度のインターフェロン含有培地を 0.1 ml / well 添加、3 日ごとに培地を交換、day 14 に Von Kossa 染色を行い石灰化巣を視覚化した。分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性の発現は次の石灰化への必須のステップであるが両マウスインターフェロン共このマーカー発現を阻害しなかった。

【0031】

一方、図 4 に示すように石灰化プロセスでは MuIFN- β と MuIFN- γ で大きな違いが現れた。すなわち、 β 型が存在しても石灰化は重大な影響を受けずに進行するのに対し、 γ 型は用量依存的で強力な石灰化阻害作用を示し、その効果はわずか 10 単位/ml という微量添加で出現し、石灰化阻害の IC50 値は約 3-4 単位/ml であった。硬組織としての骨組織が完全に修復されるためには、この γ 型 IFN の石灰化阻害は好ましくないのは言うまでもなく、 β 型の優位性は明らかであ

る。

【0032】

実施例5

マウス骨芽細胞MC3T3-E1石灰化巣のカルシウムおよび無機リンの定量：

MC3T3-E1細胞を24穴プレートの各wellに50,000個/mlで蒔き、コンフルエントに達するまで増殖後、培地を除き新たに0.9 ml / wellの10% JCS、50 μ g / mlのL-アスコルビン酸、10 mM β -グリセロリン酸加 α -MEMを添加し、次いで各濃度のインターフェロン含有培地を0.1ml/well添加、3日ごとに培地を交換し培養を継続した。day 14に培地を除去、ハンクス液で軽く洗浄、無水エタノールを1 ml / wellで添加し室温にて15分間固定後、さらに新鮮無水エタノール1 ml / wellに置換し5分処理後室温で風乾した。1Nの塩酸を1 ml / well添加し室温で30分間抽出した。全量をエッペンドルフチューブに移し1,800 \times g, 4℃、10分遠心後上清のカルシウム量をカルシウムCテストワコー、無機リン量をホスファBテストワコーで測定した。 β 型IFN添加でも若干のカルシウム沈着の抑制が見られたが、その程度は弱く1,000 units/mlでも対照に比べ20%減にとどまった。

【0033】

一方、 γ 型IFNでは用量依存的で強力な石灰化阻害作用を示し、1,000 units/mlでは対照に比べ70%減に達し、50%阻害値(IC50)は約10 units / mlと低濃度であった(図5)。図中の各点は4例の平均値および標準誤差である。さらに、石灰化巣から抽出された無機リン量は図6に示す。図中の各点は4例の平均値である。抽出された無機リン量はカルシウム量と良い相関を示し、 β 型IFN1,000 units / ml処理でも対照に比べなお約20%減にとどまり、IC50値は得られない。一方、 γ 型IFN1,000 units / ml処理では約80%減となり、そのIC50値は約10 units / mlで極めて低濃度で出現する(図6)。

【0034】

【発明の効果】

本発明により、 β 型インターフェロンの相対的な骨形成促進作用が明らかとなった。更に、 γ 型インターフェロンに見られるような石灰化不全作用は β 型では

無く、 β 型インターフェロンの骨疾患治療薬としての有用性が示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ddY 系マウス由来破骨細胞様細胞の形成に対するマウス β 型、 γ 型インターフェロンの阻害作用を示す。

【図2】 C 57 BL/6 系マウス由来破骨細胞様細胞の形成に対するマウス β 型、 γ 型インターフェロンの阻害作用を示す。

【図3】 マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の増殖に対するマウス β 型、 γ 型インターフェロンの作用を示す。

【図4】 マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の石灰化に対するマウス β 型、 γ 型インターフェロン間の作用の違いを示す。

【図5】 マウスインターフェロンで処理したマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の石灰化巣から抽出したカルシウム量を示す。

【図6】 マウスインターフェロンで処理したマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1株の石灰化巣から抽出した無機リン量を示す。

【書類名】 図面

【図1】

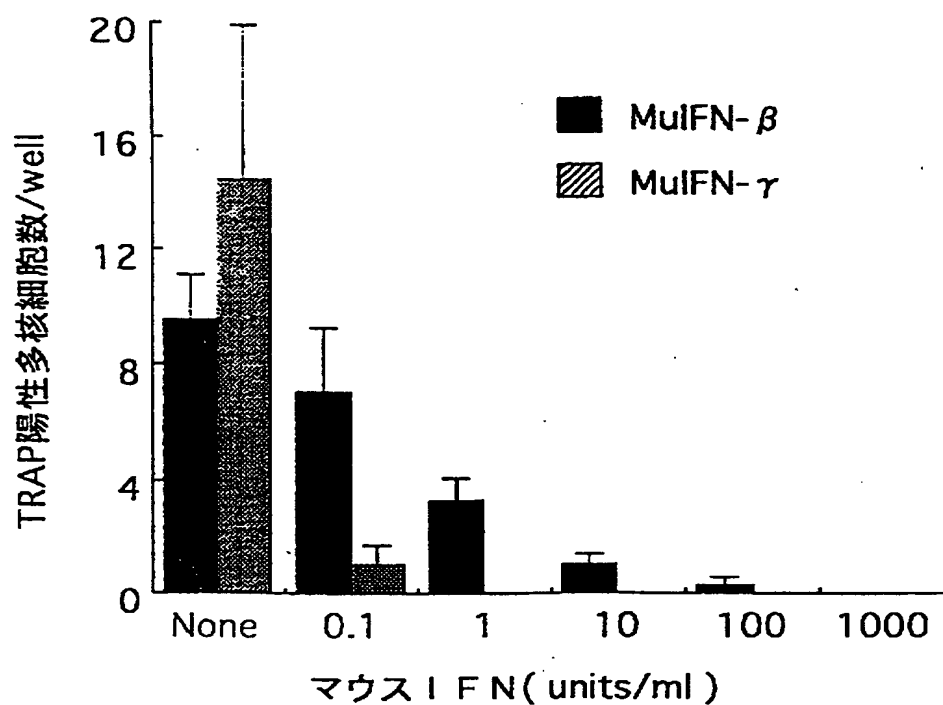


図1 : In vitro破骨細胞形成系に於けるマウス IFNによるTRAP陽性多核細胞形成に対する阻害効果。Takahashi et alの方法に従い6週齢 d d y系雄マウスの骨髓細胞を活性型Vit D3存在下で培養を開始、同時に各種濃度のマウス IFNを添加した。3日毎に培地を交換しday 14に酒石酸耐性酸フォスファターゼ染色を行い顕微鏡下でTRAP陽性多核細胞数を測定した。Mean±S.E.(n=4)。

【図 2】

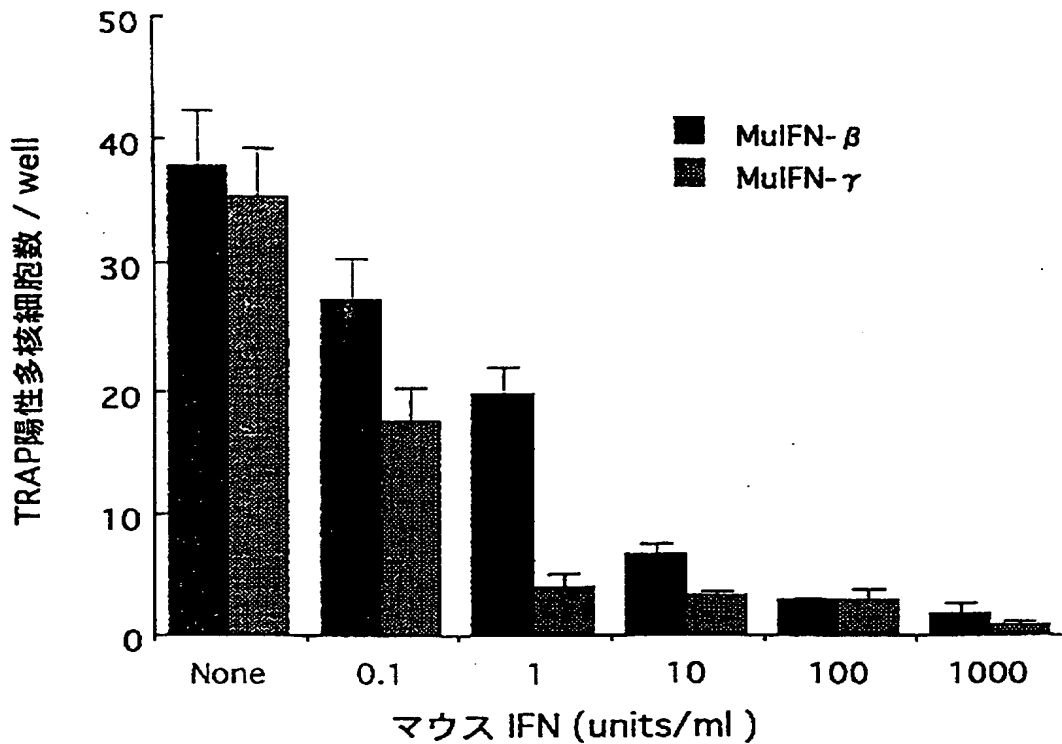


図 2 : In vitro破骨細胞形成系に於けるマウス IFN による TRAP 陽性多核細胞形成に対する阻害効果。Takahashi et al の方法に従い 6 週齢 C57BL/6 系雄マウスの骨髓細胞を活性型 Vit D3 存在下で培養を開始、同時に各種濃度のマウス IFN を添加した。3 日毎に培地を交換し day 14 に酒石酸耐性酸フォスファターゼ染色を行い、顕微鏡下で TRAP 陽性多核細胞数を測定した。Mean \pm S.E. (n=4)。

【図3】

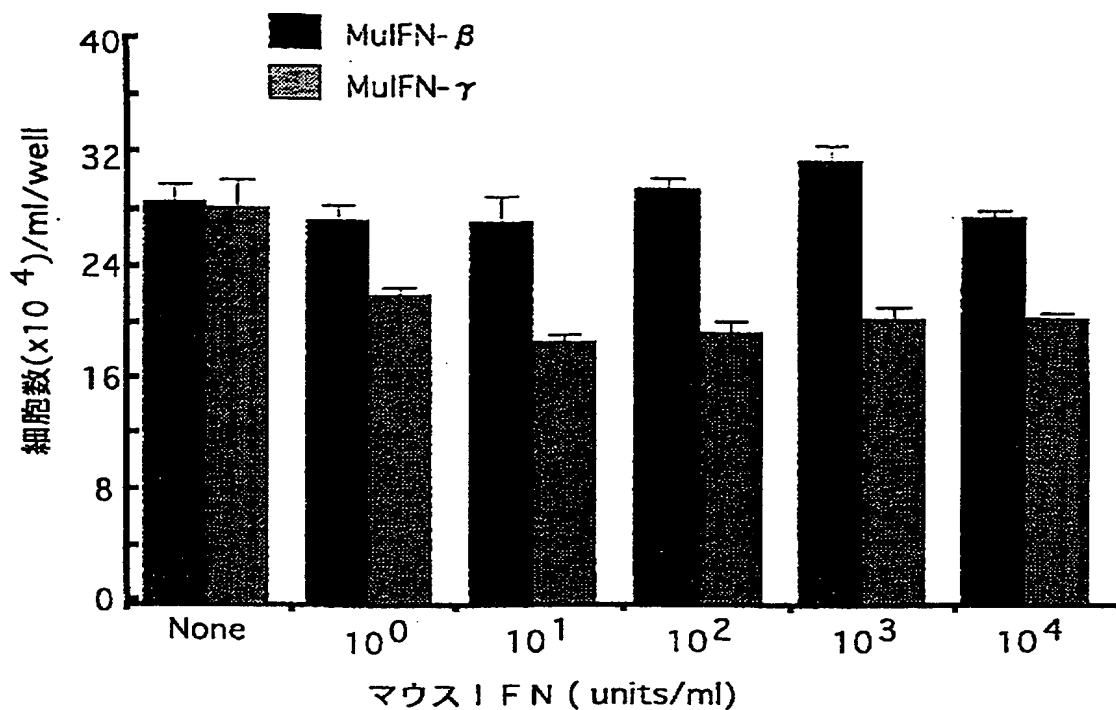


図3：マウス骨芽細胞MC3T3-E1増殖に対するマウスインターフェロンの作用。インターフェロンはday 0およびday 2に添加し、day 6に細胞数をコールターカウンターにより測定。Mean \pm S.E.(n=4)。

【図4】

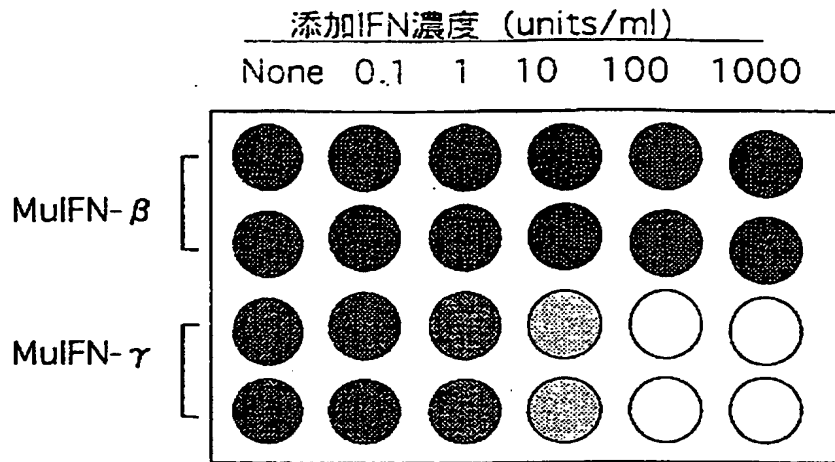


図4：マウス骨芽細胞MC3T3-E1の石灰化に対するマウスIFNの作用

24穴プレートの各wellにMC3T3-E1細胞を 5×10^4 個/ml蒔いて培養を開始、day 4にコンフルエントに達したことを顕微鏡下を確認後、培地を除去し各IFN濃度を含んだ石灰化用培地に置き換え(0.5ml/well)培養を継続、途中4日毎に培地を交換。Day 14にVon Kossa染色を行った。

【図5】

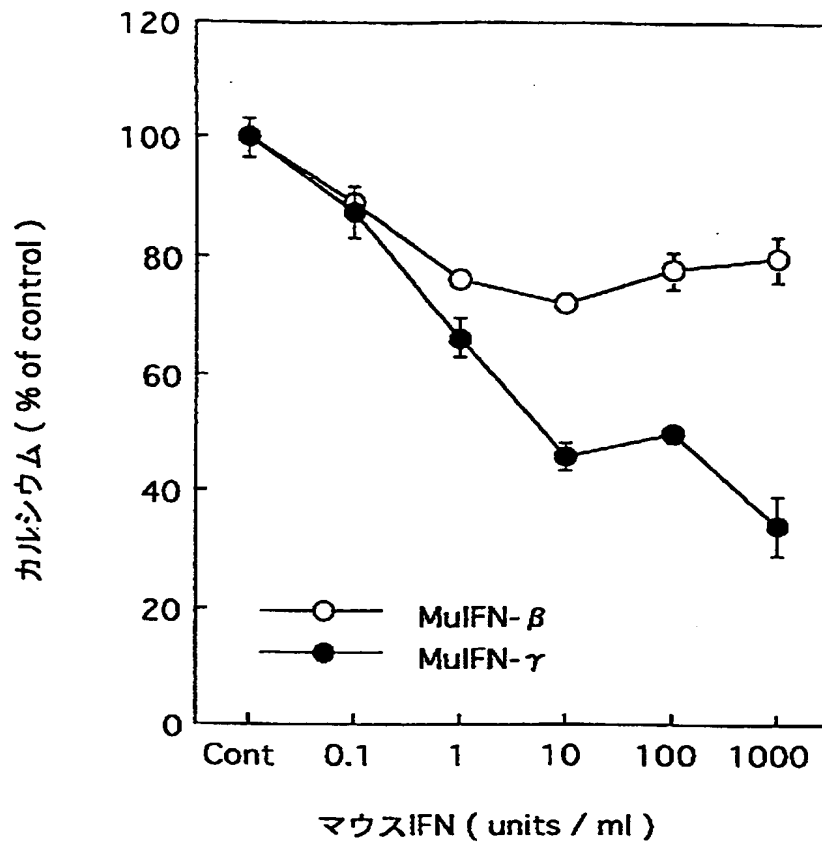


図5：マウスIFN処理後のMC3T3-E1石灰化巣に沈着したカルシウム含量。

【図6】

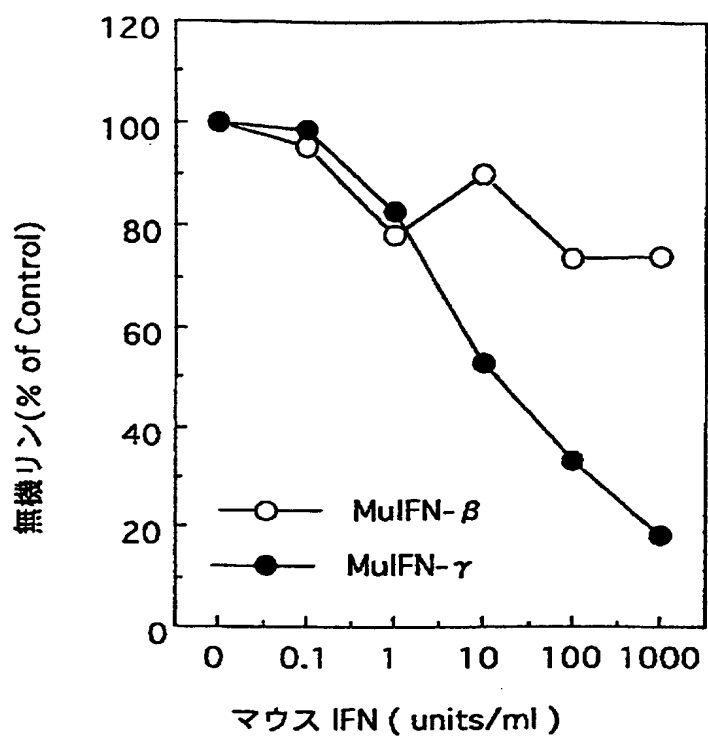


図6：マウスIFN処理後のMC3T3-E1細胞の石灰化巣に沈着した無機リン含量。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 β 型インターフェロンを有効成分として含む医薬品。

【効果】 本発明により、 β 型インターフェロンの相対的な骨形成促進作用が明らかとなった。更に、 γ 型インターフェロンに見られるような石灰化不全作用は β 型では無く、 β 型インターフェロンの骨疾患治療薬としての有用性が示された。

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000003159

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

【氏名又は名称】

東レ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003159]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
氏 名 東レ株式会社